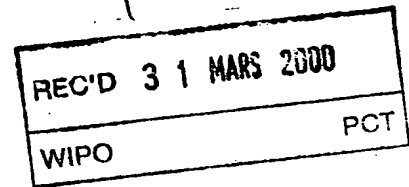


09/913767



## Bescheinigung

Herr Professor Dr. Wolf B. F r o m m e r in Tübingen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Pflanzlicher Nukleobasentransporter"

am 19. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 12 N 15/29 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. März 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Nietiedt

Aktenzeichen: 199 07 209.4



**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1  
N 20.03.00

### **Pflanzlicher Nukleobasentransporter**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die für einen pflanzlichen Nukleobasentransporter kodiert, und ihre Verwendung. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Fragment der Nukleinsäure, ein Konstrukt, das die Nukleinsäure und/oder ein Fragment davon enthält, und eine Wirtszelle. Von der vorliegenden Erfindung umfaßt werden ferner ein Verfahren zum Herstellen einer transgenen Pflanze sowie ein Verfahren zum Beeinflussen der Nukleobasentransporteigenschaften einer Pflanze, eines Pflanzenteils, einer Pflanzenzelle und/oder von Samen.

Transporter spielen in der Funktion eines Organismus eine besondere Rolle. Zum einen entscheiden sie über die Aufnahme oder Abgabe eines Stoffes in eine oder aus einer Zelle bzw. einem Organismus, andererseits steuern sie den Transport und die Verteilung der Stoffe zwischen den Zellen. Transporter stehen in der Regel am Anfang oder Ende eines Stoffwechselwegs und nehmen daher grundsätzlich übergeordnete Kontrollfunktionen wahr.

Zu den Transportmetaboliten, die als Bausteine für Nukleinsäuren dienen, zählen Purinbasen, Pyrimidinbasen und die daraus abgeleiteten Nukleoside und Nukleotide. Die Aufnahme dieser Substanzen hat zum Beispiel während der Pollenkeimung und der frühen Entwicklung des Embryos in keimenden Samen eine wichtige physiologische Bedeutung bei der Bereitstellung von Vorstufen für die Nukleinsäuresynthese. Cytokinine sind als Phytohormone strukturell eng mit den Purinbasen und den Purinnukleosiden verwandt. Diese Phytohormone regulieren viele Prozesse während der Pflanzenentwicklung. Über den Ursprung dieser Hormone ist zwar wenig bekannt, ihr effektiver Transport in der Pflanze ist jedoch für deren Entwicklung von entscheidender Bedeutung.

In Bakterien wurden Nukleobasen-Transportsysteme für Adenin, Cytosin und Uracil charakterisiert und die entsprechenden Gene kloniert werden (Burton, 1983, *J. Gen. Microbiol.* 129, 3505-3513; Danielsen et al., 1992, *Mol. Microbiol.* 6, 1335-1344; Anderson et al., 1995, *J. Bacteriol.* 177, 2008-2013). Bei der Cytosin- und der Uracil-Permease handelt es sich um hydrophobe Proteine mit 9-12 möglichen membrandurch-

spannenden Regionen (Danielsen et al., 1995, *Microbiol.* 141, 2905-2913; Anderson et al., 1995, *J. Bacteriol.* 177, 2008-2013).

In *Escherichia coli* wurden bisher zwei aktive Nukleosid-Transportsysteme mit hoher Affinität beschrieben (Mygind & Munch-Petersen, 1975, *Eur. J. Biochem.* 59, 365-372; Munch-Petersen et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254, 3730-3737) und kloniert (Westh-Hansen, 1987, *Eur. J. Biochem.* 168, 385-391). Das *nupC*-System vermittelt den Transport von Nukleosiden mit Ausnahme von Guanotin und Deoxyguanotin, während das zweite *nupG*-System alle Nukleoside transportiert. Die Aufnahme von intakten Nukleosiden ist energieabhängig und wird im Fall von Uridin und Cytosin entweder durch Elektronentransport oder ATP-Hydrolyse energetisiert (Roy-Burman et al., 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 511, 285-296). Neben dieser Aufnahme von intakten Nukleosiden wurde ein weiterer Aufnahmemechanismus beschrieben. Bei diesem Translokationsprozeß wird das Nukleosid durch eine Phosphorylase in die Base und die Ribose gespalten und der Riboseanteil in die Zelle aufgenommen. Die Base dagegen wird ins Medium freigesetzt (Rader & Hochstadt, 1976, *J. Bacteriol.* 128, 290-301; Roy-Burman & Visser, 1981, *Biochim. Biophys. Acta* 646, 309-319). Die Nukleobasen können dann über spezifische Nukleobasentransporter aufgenommen werden.

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher drei unterschiedliche, aktive Transportsysteme für Nukleoside und Nukleobasen sowohl genetisch als auch physiologisch gut charakterisiert (Grenson, 1969, *Eur. J. Biochem.* 11, 249-260; Pickering & Woods, 1972, *Biochim. Biophys. Acta* 264, 45-58; Chevallier et al., 1975, *J. Bacteriol.* 122, 629-641; Losson et al., 1978, *Biochim. Biophys. Acta* 513, 296-300). Neben einer spezifischen Permease für Uridin und einer spezifischen Permease für Uracil existiert ein weiteres Transportsystem, welches die Aufnahme von Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Cytosin katalysiert, die sogenannte Purin-Cytosin-Permease. Die Gene für die Uracil-Permease und für die Purin-Cytosin-Permease wurden kloniert und sequenziert (Chevallier, 1982, *Mol. Cell. Biol.* 2, 977-983; Jund et al., 1988, *Eur. J. Biochem.* 171, 417-424; Weber et al., 1990, *Mol. Microbiol.* 4, 585-596) und anhand der abgeleiteten Proteinsequenzen wurden Strukturmodelle für die Proteine vorgeschlagen. Bei den beiden Permeasen handelt es sich um sehr hydrophobe Proteine. Die Analyse der

Primärstruktur mit zwei verschiedenen Methoden zur Voraussage der Sekundärstruktur ergab, daß beide Proteine 9 bis 12 mögliche Transmembranregionen besitzen (Weber et al., 1988, *J. Mol. Evol.* 27, 341-350). Weitere Untersuchungen zur Uracil- und Purin-Cytosin-Aufnahme zeigten, daß es sich bei der Aufnahme um einen Substrat-Protonen Symportmechanismus handelt (Hopkins et al., 1988, *FEMS Microbiol. Lett.* 49, 173-177; Brethes et al., 1992, *Eur. J. Biochem.* 210, 785-791). Für alle drei oben beschriebenen Transportsysteme in *Saccharomyces cerevisiae* existieren Mutanten mit stark verminderter Aufnahmekapazität (Grenson, 1969, *Eur. J. Biochem.* 11, 249-260; Polak & Grenson, 1973, *Eur. J. Biochem.* 32, 276-282).

Nukleosidtransportsysteme sind in einer Vielzahl von Säugetierzellen beschrieben und charakterisiert worden (Miras-Portugal et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261, 1712-1719; Crawford et al., 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 13730-13734). Es werden mindestens fünf verschiedene Gruppen von Transportsystemen unterschieden (Huang et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 17757-17760). Zwei von ihnen vermitteln die passive Aufnahme von Nukleosiden durch erleichterte Diffusion. Nach ihrer Sensitivität gegenüber Inhibitoren werden sie in *es*(equilibrative sensitive)- und in *ei*(equilibrative insensitive)-Transporter unterteilt. Bei den anderen drei Transportsystemen handelt es sich um sekundär aktive,  $\text{Na}^+$ -abhängige Cotransporter, die anhand ihrer Substratspezifität unterschieden werden. *Cif*-Transporter sind Purin-Nukleosid-spezifisch, während *cit*-Transporter hauptsächlich Pyrimidinnukleoside als Substrat akzeptieren. Es besteht allerdings eine Überlappung in der Spezifität insoweit, als beide Transporter Uridin und Adenosin transportieren können. Darüber hinaus existiert ein mit *Cib* bezeichnetes Transportsystem mit breiter Substratspezifität. Mit Hilfe heterologer Expressionsklonierung in *Xenopus*-Oozyten konnten cDNAs isoliert werden, die für  $\text{Na}^+$ -abhängige Nukleosid-Cotransporter kodieren (Huang et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 17757-17760; Che et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 13596-13599). Bei den aus offenen Leserahmen abgeleiteten Proteinen handelt es sich um sehr hydrophobe Proteine mit 14 möglichen membrandurchspannenden Regionen. Neben diesen Nukleosidtransportsystemen wurden auch spezifische Transportsysteme für Nukleobasen in Säugetierzellen beschrieben (Griffith & Jarvis, 1993, *J. Biol. Chem.* 268, 20085-20090; Washington & Giacomini, 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 22816-22819). Auch hier kann zwischen der Aufnahme durch erleichterte Diffusion

und  $\text{Na}^+$ -abhängigen Cotransport unterschieden werden. Gene, die für Nukleobasentransporter kodieren, wurden bisher noch nicht isoliert.

In höheren Pflanzen sind Transportprozesse zur Verteilung von Assimilaten, Metaboliten und Phytohormonen von entscheidender physiologischer Bedeutung. Dabei wird zwischen dem Fern- oder Langstreckentransport, der bei höheren Pflanzen im Xylem und Phloem erfolgt, dem Nahtransport (Transport von Zelle zu Zelle) und dem intrazellulären Transport (Transport zwischen verschiedenen Kompartimenten) unterschieden. Die meisten dieser Transportprozesse sind mit dem Stoffdurchtritt durch Membranen verbunden. Zwischen dem Nahtransport und dem Langstreckentransport besteht oft ein enger Zusammenhang, wie zum Beispiel bei der Aufnahme von Nährsalzen durch die Wurzel und deren Transport im Xylem oder bei der Beladung des Phloems mit Assimilaten. Sowohl der Langstreckentransport als auch der Transport über Membranen ist für Nährsalze, Zucker und Aminosäuren gut charakterisiert und es konnten entsprechende Transportsysteme identifiziert werden.

Über den Transport von Nukleobasen und deren Derivate in Pflanzen ist jedoch nur sehr wenig bekannt und es wurden bisher im Gegensatz zu Bakterien, Pilzen und Säugetieren nur wenige Transportsysteme für diese Substanzen beschrieben. In der Grünalge *Chlorella fusca* wurde die Existenz spezifischer, aktiver Aufnahmesysteme für Uracil und Guanin beschrieben (Knutsen, 1972, *Physiol. Plant* 27, 300-309; Pettersen & Knutsen, 1974, *Arch. Microbiol.*, 96 233-246). Die Aufnahme von Adenin durch Zellkulturen von *Acer pseudoplatanus* wurde von Dorée (1973, *Physiol. Vég.* 11, 267-290) beschrieben, der Mechanismus der Uridinaufnahme in der Wasserlinse *Lemna gibba* wurde näher charakterisiert (Nakashima & Tsuzuki, 1976, *Plant Cell Physiol.* 17, 701-711). Eingehendere Studien über die Aufnahme von Nukleosiden und Nukleobasen wurden an *Petunia*-Pollen durchgeführt. Für die beiden Purinnukleoside Adenosin und Guanosin konnte die Aufnahme gegen das Konzentrationsgefälle nachgewiesen werden (Kamboj & Jackson, 1987, *Plant Physiol.* 84, 688-691). Zudem werden in *Petunia*-Pollen auch die beiden Pyrimidinnukleoside Uridin und Cytidin über ein spezifisches Transportsystem aufgenommen (Kamboj & Jackson, 1984, *Plant Physiol.* 75, 499-501; Kamboj & Jackson, 1985, *Plant Physiol.* 79, 801-805). Obwohl mehrere Hinweise auf einen akti-

ven Transportprozeß schließen lassen, konnte aufgrund der starken Phosphorylierung von Nukleosiden innerhalb der Zelle nicht eindeutig zwischen aktivem und passivem Transport unterschieden werden. Aufgrund der generellen biochemischen Ähnlichkeiten der Pyrimidin- und Purin-Nukleosidaufnahme in *Petunia*-Pollen wird spekuliert, daß die Pyrimidin- und Purin-Nukleosidaufnahme von einem gemeinsamen Transportsystem vermittelt wird (Kamboj & Jackson, 1987, *Plant Physiol.* 84, 688-691). Eine Ausnahme besteht allerdings für das Pyrimidinnukleosid Thymidin. Der Transport von Thymidin zeigt die charakteristischen Eigenschaften einer erleichterten Diffusion und erfolgt daher wahrscheinlich über ein eigenes Transportsystem.

Eine "carrier"-vermittelte Aufnahme von Nukleosiden wurde auch bei *Ricinus*-Cotyledonen beschrieben (Kombrink & Beevers, 1983, *Plant Physiol.* 73, 370-376). Zudem konnten Kombrink und Beevers zeigen, daß auch die Aufnahme von Purin- und Pyrimidin-Basen in *Ricinus*-Cotyledonen durch sättigbare Transportsysteme erfolgt. Da auch die Aufnahme des Nukleotids AMP einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt, und die  $V_{\max}$ -Werte für Adenin, Adenosin und AMP trotz unterschiedlicher  $K_m$ -Werte übereinstimmen, wird für diese drei Substanzen ein gemeinsames Transportsystem mit jeweils unterschiedlicher Spezifität postuliert. Es konnte bei den beschriebenen "Carrier" in *Ricinus*-Cotyledonen nicht gezeigt werden, ob es sich um aktive, akkumulierende oder um passive, nicht akkumulierende Transportsysteme handelt.

Der Aufnahme von Purin- und Pyrimidin-Nukleosiden kommt bei der Keimung von Pollen eine wichtige physiologische Bedeutung zu, weil in keimenden Pollen eine intensive RNA-Synthese stattfindet (Mascarenhas, 1975, *Bot. Rev.* 41, 259-314) und somit ein großer Bedarf an Nukleosiden als Vorstufen für die Nukleinsäuresynthese besteht. Während der Keimung und der Pollenschlauchbildung bestehen enge Wechselwirkungen zwischen Pollen und Narbe bzw. Griffel. Im *Petunia*-Griffel akkumulieren kurz nach der Pollenkeimung Purin- und Pyrimidin-Nukleoside (Van der Donk, 1974, *Mol. Gen. Genet.* 134, 93-98), die den keimenden Pollen potentiell zur Verfügung stehen. Eine aktive Aufnahme von Nukleobasen und Nukleosiden durch die Pollen bedeutet im Vergleich zu der *de novo* Synthese eine beträchtliche Energieeinsparung. Eine aktive Aufnahme von Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin durch *Petunia*-Pollen wurde von

Kamboj & Jackson (1985, *Plant Physiol.* 79, 801-805; 1987, *Plant Physiol.* 84, 688-691) beschrieben.

Eine ähnliche Situation findet sich in keimenden *Ricinus*-Sämlingen. Während der Keimung werden die Speicherreserven des Endosperms metabolisiert und zu dem wachsenden Embryo vollständig transferiert. In größerem Umfang werden besonders Saccharose und Aminosäuren vom Endosperm in die Cotyledonen des wachsenden Embryos transportiert; die Transportsysteme für diese Substanzen sind gut charakterisiert (Komor, 1977, *Planta* 137, 119-131; Robinson & Beevers, 1981, *Planta* 152, 527-533; 1981, *Plant Mol. Biol.* 5, 69-76; Williams et al., 1991, *Planta* 186, 541-550). Nach der Keimung des Embryos setzt im Endosperm neben dem Abbau von Proteinen und Lipiden auch der Abbau von Nukleinsäuren ein, und der Gehalt an Aminosäuren, Saccharose und freien Nukleotiden nimmt zu. Kombrink und Beevers (1983, *Plant Physiol.* 73, 370-276) konnten zeigen, daß isoliertes Endosperm die Abbauprodukte von Nukleinsäuren ins Medium sekretiert. Neben Guanosin und Adenosin wurde auch Adenin im Inkubationsmedium nachgewiesen. Aufnahmestudien ergaben, daß Cotyledonen Purin und Pyrimidinbasen, Nukleoside und AMP mit hoher Effizienz aufnehmen können. Bei dem Stofftransport vom Endosperm zum Embryo scheinen somit Nukleobasen und Nukleoside als Transportmetabolite für Nukleinsäuren zu fungieren.

Die Aufnahme von Adenin könnte in keimenden Samen darüber hinaus auch eine wichtige Rolle bei der ATP-Synthese spielen. In Samen setzt kurz nach der Quellung die Akkumulation von ATP ein. Dies geschieht maßgeblich unter der Beteiligung der Adeninphosphoribosyltransferase (APRT), die Adenin in AMP überführt (Moreland et al., 1974, *Plant Physiol.* 54, 560-563; Lee & Moffatt, 1994, *Physiol. Plant* 90, 739-747). Auch exogen zugeführtes Adenin kann nach der Aufnahme durch diese Reaktion in AMP und weiter in ATP überführt werden (Lee & Moffatt, 1994, *Physiol. Plant* 90, 739-747). Es wird vermutet, daß ein großer Teil des benötigten ATP über diese Bergungsaktion von Adenin bereitgestellt wird. Eine effiziente Aufnahme von Adenin wäre somit für eine ausreichende ATP-Versorgung von erheblicher Bedeutung.

Auch bei ATP-Versorgung der Siebröhren könnte Adenin als Vorstufe für die ATP-Synthese erhebliche Bedeutung haben. Der Siebröhrensaft zeichnet sich durch hohe ATP-Konzentrationen aus (Kluge et al., 1970, *Planta* 91, 68-79). Wurde anfangs noch diskutiert, daß die Geleitzellen das ATP synthetisieren, welches dann in die Siebelemente transportiert wird, konnten Becker et al. (1971, *Planta* 99, 154-162) dagegen zeigen, daß der Siebröhrensaft die stark ausgeprägte Fähigkeit hat, anorganisches Phosphat in organische Phosphorverbindungen einzubauen, darunter auch ATP. Da die Siebröhren in ihren Stoffwechselfunktionen stark eingeschränkt sind, besitzen sie aber kaum die Möglichkeit, die Vorstufen für die ATP-Synthese zu synthetisieren (Kluge et al., 1970, *Planta* 91, 68-79). In den Geleitzellen gebildetes Adenin könnte in die Siebröhren transportiert werden und als Vorstufe zur ATP-Synthese dienen.

Eine große strukturelle Ähnlichkeit mit der Nukleobase Purin zeigen einige pflanzliche Alkaloide, wie z.B. Coffein, Theobromin und Nicotin, die ebenfalls basische, N-haltige Heterocyclus aufweisen. Viele dieser Alkaloide haben eine starke physiologische, in höheren Dosen toxische Wirkung auf tierische Organismen, insbesondere auf das Nervensystem. Die Vergiftung der eigenen Zelle wird bei den Pflanzen durch die Absonderung der Substanzen in die Vakuole verhindert. Alkaloide werden oft nach ihrer Synthese zu den Orten der Speicherung transportiert. Synthese- und Speicherort können dabei weit voneinander entfernt sein. So findet die Biosynthese des Nikotins in der Wurzel statt. Nach dem Transport in die Blätter findet aber hier eine Akkumulation und die Speicherung statt (Dawson, 1942, *Am. J. Bot.* 29, 66-71). Über die molekularen biologischen Mechanismen des Transports von Alkaloiden ist jedoch wenig bekannt.

Eine weitere wichtige Stoffgruppe in Pflanzen, die große strukturelle Ähnlichkeit mit den Nukleobasen aufweist, stellen die Cytokinine dar, die die Eigenschaft haben, die Zellteilung (Cytokinese) zu fördern. Als Pflanzenhormon haben sie, im Zusammenspiel mit anderen Phytohormonen wie Auxin, Einfluß auf eine Reihe weiterer Entwicklungsprozesse wie Keimung, Knospenbildung und Seneszenz (Brzobohaty et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 26, 1483-1497). Sie enthalten Adenin als hydrophiles Grundgerüst, an dessen Aminogruppe in der Position 6 eine unpolare Seitenkette von relativ geringer Spezifität sitzt. Bei dem Kinetin handelt es sich um ein künstliches Cytokinin, welches vermutlich



11.03.00

8

gar nicht natürlich in der Pflanze vorkommt. Das wohl aktivste aller natürlichen Cytokinine ist das Zeatin. Auch Bakterien und Pilze werden als Quelle für Cytokinine diskutiert (Holland, 1977, *Plant Physiol.* 115, 865-868).

Der Hauptsyntheseort der Cytokinine ist die Wurzel. Da sie weit ab vom Syntheseort ihre physiologische Wirkung entfalten, müssen Cytokine zwangsläufig durch die Pflanze transportiert werden. Von der Wurzel gelangen sie in die Wasserleitungsbahnen des Xylems und werden mit dem Transpirationsstrom aufwärts transportiert und innerhalb der Pflanze verteilt. Während Transport und Verteilung der Cytokinine Gegenstand mehrerer Untersuchungen waren (Neuman et al., 1990, *J. Exp. Bot.* 41, 1325-1334; Beck & Wagner, 1994, *Bot. Acta* 107, 342-348; Soejima et al., 1995, *Plant Cell Physiol.* 36, 1105-1114), ist über die molekularbiologischen Mechanismen des Transports wenig bekannt.

Eine Aufklärung der Nukleobasen-Transportvorgänge bei Pflanzen, die zu ähnlich detaillierten Informationen wie bei anderen Organismen führen würde, liegt nicht vor und ist wegen der Schwierigkeit der molekularbiologischen Analyse von Mutationen in Pflanzen kaum durchführbar. Es besteht jedoch ein großes Interesse an der Identifizierung und Charakterisierung von Pflanzengenen, die für Nukleobasentransporter bzw. für Transporter für chemisch verwandte Stoffe kodieren. Ferner besteht aufgrund der zentralen Funktion der Transporter ein großes Interesse an Pflanzen, die in der Lage sind, größere Mengen Nukleobasen und ihre Derivate zu transportieren, sowie an der Bereitstellung von Möglichkeiten zur Veränderung der Verteilung von Nukleobasen in transgenen Pflanzen und Mutanten.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine für einen pflanzlichen Nukleobasentransporter kodierende Nukleinsäure bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Nukleinsäure gelöst, ausgewählt aus:

- a) Nukleinsäure, die erhältlich ist durch Komplementieren Nukleobasentransporter-defizienter Wirtszellen mit einer pflanzlichen Genbank und Selektieren auf Nukleobasentransporter-positive Wirtszellen;
- b) Nukleinsäure mit einer Sequenz, die für ein Protein mit einer Sequenz nach der SEQ ID NO 8 kodiert;
- c) Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach b) hybridisiert;
- d) Nukleinsäure, die unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes mit einer Nukleinsäure nach b) oder mit der zu b) komplementären Sequenz hybridisieren würde;
- e) durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltener Derivate einer Nukleinsäure nach a) bis d);
- f) Komplementäre Nukleinsäure zu einer Nukleinsäure nach einer der Gruppen a) bis e);

ausgenommen sind Nukleinsäuren mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5.

Der Begriff "Nukleobase", wie hier verwendet, umfaßt nicht nur Nukleobasen und ihre Derivate, sondern auch mit den Nukleobasen chemisch verwandte Stoffe, beispielsweise Adenin und seine Derivate, wie Xanthin, Hypoxanthin, Allantoin, Allantoat, Urat, Xanthosin oder Inosin, Cytosin und seine Derivate wie Barbiturate oder Folsäure, Cytokinine, wie z.B. Zeatin oder Kinetin, und bestimmte Alkaloide, wie z.B. Coffein, Theobromin oder Nikotin.

Der Ausdruck "Nukleobasentransporter" im Sinne der Erfindung bezeichnet ein Protein, das an dem aktiven Transport von mindestens einem der vorgenannten Metabolite durch eine Biomembran gegen einen Konzentrationsgradienten beteiligt ist. Zum Nachweis der Nukleotransporter-Aktivität kann beispielsweise die von Ninnemann et al. (1994, *EMBO J.* 15, 3464-3471) beschriebene Methode angewandt werden.

11 30.03.00

10

"Komplementation", wie hier verwendet, bezeichnet eine sich im Phänotyp widerspiegelnde Kompensation eines genetischen Funktionsdefektes unter Beibehaltung der dem Defekt zugrundeliegenden Mutationen. Komplementation im Sinne der Erfindung liegt beispielsweise vor, wenn ein genetischer Defekt in einem Gen (z.B. das FCY2-Gen in *Saccharomyces cerevisiae*) durch die Anwesenheit eines gleichartigen, intakten Gens (z.B. das PUP1-Gen aus *Arabidopsis thaliana*) aufgehoben wird, das die Funktion des defekten Gens übernimmt.

Unter "Nukleobasentransporter-defizienten Wirtszellen" im Sinne der Erfindung versteht man Zellen, die aufgrund eines genetischen Defektes negativ veränderte Nukleobasentransporteigenschaften aufweisen, die zu einem negativ selektierbaren Phänotyp führen. Nukleobasentransporter-positive Wirtszellen enthalten eine pflanzliche Nukleinsäure, die zur partiellen Aufhebung des genetischen Defekts führt, und zeigen daher einen positiv selektierbaren Phänotyp.

Die Identifikation eines Nukleobasentransporters kann beispielsweise durch Komplementation von spezifischen Mutationen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgen. Zur Isolierung eines Gens, das ein Transportermolekül kodiert, aus einer pflanzlichen Genbank müssen zunächst geeignete Hefe-Mutanten verfügbar sein, die aufgrund eines Defektes in diesem Transportermolekül nicht in der Lage sind, eine bestimmte Substanz aufzunehmen. Eine Mutante, die nicht in der Lage ist, in Medien mit Nukleobasen als einziger Stickstoffquelle zu wachsen, ist beispielsweise die von Grenson (Grenson, 1969, *Eur. J. Biochem.* 11, 249-260; Polak & Grenson, 1973, *Eur. J. Biochem.* 32, 276-282) beschriebene Mutante *fcy2* (Stamm MG887). Um eine Komplementation mit pflanzlichen Genen durchführen zu können, wurde zusätzlich das URA3-Gen zerstört und somit eine Uracil-Auxotrophie erzeugt (MG887ura3<sup>-</sup>).

Eine geeignete Hefemutante, wie beispielsweise die *fcy2/ura3*-Mutante, wird mit für die Verwendung in Hefe geeigneten Expressions-Plasmiden, die als Insertion cDNA-Fragmente aus einer pflanzlichen cDNA-Bibliothek tragen, transformiert. Durch Selektion von Transformanten, die infolge der Expression pflanzlicher cDNA-Sequenzen in der Lage

sehen werden. Derartige Elemente sind bereits beschrieben worden (siehe z.B. Gielen et al., 1984, *EMBO J.* 8, 23-29). Der transkriptionelle Startbereich kann sowohl nativ (homolog) als auch fremdartig (heterolog) zum Wirtsorganismus sein. Die Sequenz der Transkriptionsstart- und -terminationsregionen kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Bestandteilen enthalten. Vorzugsweise befindet sich die Nukleinsäure bzw. das Fragment in dem Konstrukt in Antisinnorientierung zum dem regulatorischen Element. Das Konstrukt kann beispielsweise in das pflanzliche Genom eingeführt werden und nach seiner Transkription zur Unterdrückung der Bildung der pflanzeigenen Nukleobasentransportermoleküle führen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung liegt das Konstrukt in einem Plasmid vor.

Das Plasmid kann ein Replikationssignal für *E. coli* oder Hefe und ein Marker-Gen enthalten, das die positive Selektion der mit dem Plasmid transformierten Wirtszellen erlaubt. Wird das Plasmid in eine pflanzliche Wirtszelle eingeführt, so können je nach Einführungsmethode weitere Sequenzen erforderlich sein, die dem Fachmann bekannt sind. Ist das erfindungsgemäße Plasmid beispielsweise ein Derivat des Ti- oder Ri-Plasmids, so muß die einzuführende Nukleinsäure bzw. das einzuführende Fragment von T-DNA-Sequenzen flankiert werden, die die Integration der Nukleinsäure bzw. des Fragments ins Pflanzengenom ermöglichen. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und u.a. in EP 120 516, Hoekema, The Binary Plant Vector System, Offset-drukkerij Kanters B.V. Ablasserdam, (1985), Kapitel V, Fraley et al., *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 1-46 und An et al., 1985, *EMBO J.* 4, 277-287 beschrieben worden. Ist die eingeführte Nukleinsäure bzw. das Fragment einmal im Genom integriert, so sind sie dort in der Regel stabil und bleiben auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Die integrierte Sequenz kann ebenfalls einen Selektionsmarker enthalten, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum, wie z.B. Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin vermittelt. Der individuell verwendete Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen gestatten, denen die eingefügte DNA fehlt.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Wirtszelle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und/oder eine Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 und/oder ein Fragment der vorgenannten Nukleinsäuren und/oder ein erfindungsgemäßes Konstrukt enthält. Die Wirtszelle gemäß der vorliegenden Erfindung kann aus Bakterien, Hefe-, Säuger- und Pflanzenzellen ausgewählt werden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung eine transgene Pflanze sowie Pflanzenteile und/oder Samen dieser Pflanze, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder eine Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 und/oder ein Fragment der vorgenannten Nukleinsäuren und/oder ein erfindungsgemäßes Konstrukt enthalten. Vorzugsweise ist die Nukleinsäure, das Fragment und/oder das Konstrukt an einer Stelle des Genoms integriert, die nicht seiner natürlichen Position entspricht.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Protein, das durch Expression einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 in einer Wirtszelle erhältlich ist. Die jeweiligen Initiationscodons (ATG) der Sequenzen Nrn. 1 bis 7 wurden im Sequenzprotokoll durch Unterstreichung gekennzeichnet. Vorzugsweise besitzt das Protein die gleichen Nukleobasentransporteigenschaften wie das von der SEQ ID NO 1 kodierte Protein. Zum Nachweis der Aktivität eines solchen Proteins können beispielsweise Aufnahmeexperimente durchgeführt werden, wie im Ausführungsbeispiel beschrieben. Antikörper, die mit einem erfindungsgemäßen Protein reagieren, werden von der Erfindung ebenfalls umfaßt.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zum Herstellen einer transgenen Pflanze. Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das folgende Schritte umfaßt:

- Einbringen einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 und/oder eines erfindungsgemäßen Fragments der vorgenannten Nukleinsäuren in eine Pflanzenzelle; und
- Regenerieren einer Pflanze aus der transformierten Pflanzenzelle.

Transgene Pflanzen, die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden, können z.B. von Tabak-, Kartoffel-, Tomaten-, Zuckerrüben-, Sojabohnen-, Erbsen-, Bohnen-, Baumwoll-, Reis- oder Maispflanzen abgeleitet sein.

Für das Einbringen der Nukleinsäure bzw. des Fragments in eine Pflanzenzelle stehen neben der Transformation mit Hilfe von Agrobakterien noch zahlreiche weitere Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Fusion von Protoplasten, die Mikroinjektion von DNA, die Elektroporation sowie ballistische Methoden und Virusinfektion. Aus den transformierten Pflanzenzellen können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA getestet werden.

Anders als bei der Transformation mit Hilfe von Agrobakterien, werden bei der Injektion und Elektroporation an sich keine speziellen Anforderungen an den Vektor gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens vorteilhaft. Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanzen in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., 1986, *Plant Cell Reports* 5, 81-84). Diese Pflanzen können wie üblich angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zum Beeinflussen der Nukleobasentransportereigenschaften einer Pflanze, eines Pflanzenteils, einer Pflanzenzelle und/oder von Samen, das den folgenden Schritt umfaßt:

- Einbringen einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 und/oder eines erfindungsgemäßen Fragments der vorgenannten Nukleinsäuren in eine Pflanzenzelle und/oder eine Pflanze.

Zur Beeinflussung der Nukleobasentransportereigenschaften einer Pflanze eignen sich sowohl Veränderungen der Spezifität des Transportsystems, die den Transport neuer Verbindungen ermöglichen, als auch solche die eine Änderung des Transportmechanismus hervorrufen. Beispielsweise sind Veränderungen möglich, die die Affinität oder Substratspezifität des Transporters dahingehend verändern, daß es zu einem effizienteren Nukleobasentransport in die Blätter oder zu einer Veränderung der apikalen Dominanz, des Blühverhaltens oder der Seneszenz kommt, oder daß eine verbesserte Verteilung von Pestiziden ermöglicht wird.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen können zur Regeneration und Herstellung ganzer Pflanzen verwendet werden. Die Nukleinsäure gemäß der Erfindung sowie Nukleinsäuren mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 können dazu verwendet werden, homologe Sequenzen aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Tieren und/oder Menschen zu isolieren. Um nach homologen Sequenzen suchen zu können, müssen zunächst Genbanken angelegt werden, die für den Gehalt an Genen eines Organismus oder für die Expression von Genen in diesem Organismus repräsentativ sind. Erstere sind genomische, letztere sind cDNA-Banken. Aus diesen können mit Hilfe einer Sonde aus den vorgenannten Nukleinsäuren verwandte Sequenzen isoliert werden. Hat man die dazugehörigen Gene identifiziert und isoliert, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz kodierten Proteine möglich.

● Eine weitere Verwendung der vorgenannten Nukleinsäuren betrifft die Expression eines Nukleobasentransporters in pro- und/oder eukaryontischen Zellen. Werden die vorgenannten Nukleinsäuren in eine prokaryontische Zelle eingeführt, so wird eine von Bakterien translatierbare RNA-Sequenz eines eukaryontischen Nukleobasentransporters gebildet, die trotz der erheblichen Unterschiede in den Membranstrukturen von Pro- und Eukaryonten in einen funktionalen eukaryontischen Nukleobasentransporter mit dessen Substratspezifität translatiert wird. Dies ermöglicht die Verwendung von Bakterienstämmen für Studien der Eigenschaften des Transporters sowie seiner Substrate. Die vorgenannten Nukleinsäuren können ebenfalls unter der Kontrolle eines regulatorischen Elements in Antisinnorientierung zur Hemmung der Expression eines endogenen Nukleobasentransporters in pro- und/oder eukaryontischen Zellen verwendet werden. Die

Herstellung transgener Nutzpflanzen stellt eine weitere Verwendungsmöglichkeit dieser Nukleinsäuren dar.

Die folgenden Figuren und Beispiele erläutern die Erfindung.

Figur 1 zeigt eine Hydrophobizitätsanalyse des PUP-Nukleobasentransporterproteins nach Kyte und Doolittle.

Figur 2 zeigt die in Form eines Diagramms dargestellten Ergebnisse eines Aufnahme-experiments, bei dem die Cytosinaufnahmerate des Hefestamms MG877ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 und des Wildtypstamms  $\Sigma$ 1278b (Dubois & Grenson, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 175, 67-76) bei verschiedenen pH-Werten gemessen wurde. Die Substratkonzentration betrug 100  $\mu$ M.

Figur 3 zeigt die in Form eines Diagramms dargestellten Ergebnisse eines Aufnahme-experiments, bei dem die Cytosinaufnahme des Hefestamms MG877ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 mit und ohne Zugabe von Glukose gemessen wurde. Die Zellen wurden vor Beginn der Aufnahmemessung zweimal mit Wasser gewaschen und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Fünf Minuten nach Beginn der Messungen wurde einem der Versuchsansätze Glukose bis zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt.

Figur 4 zeigt eine Analyse der Substratspezifität des in Hefe exprimierten PUP1-Nukleobasentransporters (schwarze Balken) im Vergleich zu dem Hefe-eigenen FCY2-Transporter (weiße Balken).

Figur 5 zeigt eine Analyse der kompetitiven Inhibition des durch den PUP1-Nukleobasentransporter vermittelten Adenintransports durch die Cytokinine Kinetin und Zeatin.

Figur 6a zeigt eine schematische Darstellung des Plasmids p35S-PUP1, ein Derivat des Plasmids pBIN19 (Bevan, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12, 8711-8721). A steht für ein Fragment aus dem Genom des Blumenkohlmosaik-Virus, das den 35S-Promotor (nt 6909-7437) trägt. Das Promotor-Fragment wurde als *EcoRI/KpnI*-Fragment aus dem



& Grenson, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 175, 67-76) mit der Mutation *fcy2* verwendet, nachdem eine *ura3*-Defizienz eingeführt worden war.

- c) Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*: Der DNA-Transfer in die Agrobakterien erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen und Willmitzer (1988, *Nucl. Acids Res.* 16, 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurden nach der Methode von Birnboim und Doly (1979, *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.
- d) Pflanzentransformation: Die Pflanzentransformationen kann durch *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm C58C1, pGV2260)-vermittelten Gentransfer erfolgen (Deblaere et al., 1985, *Nucl. Acids Res.* 13, 4777-4788). Die Transformation von *A. thaliana* wird beispielsweise mittels Vakuum-Infiltration (modifiziert nach Bechtold et al. (1993) *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III, Sciences de la Vie* 316: 1194-1199) ausgeführt. Töpfe (Durchmesser 10 cm) werden mit Erde gefüllt und anschließend mit einem Fliegennetz überspannt. Auf diesem Netz werden *A. thaliana*-Samen ausgesät. Sechs bis acht Wochen nach dem Aussäen wurden die Pflanzen für die Vakuum-Infiltration benutzt. Zur Vakuum-Infiltration wurden von den entsprechenden *Agrobacterium*-Stämmen 2 x 1 Liter Kulturen in YEB + Antibiotikum (50 µg/ml Kan und 100 µg/ml Rif) bei 28°C angezogen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,5 werden die Zellen bei 3000 g geerntet und in 600 ml Infiltrationsmedium (0,5 x MS Medium (Sigma), 5% Saccharose, 44 µM Benzylaminopurin) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird in 250 ml Weckgläser gefüllt und in einen Exsikkator gestellt. Die *A. thaliana*-Pflanzen werden "kopfüber" in die Bakteriensuspension getaucht, dann wird für 5 min Vakuum angelegt. Nach 3-4 Wochen werden die Samen dieser Pflanzen geerntet. Zur Oberflächensterilisation werden die Samen 10 min lang in 4% Natriumhypochlorid, 0,02% Triton geschüttelt, bei 1500 g abzentrifugiert, viermal mit sterilem Wasser gewaschen und in 3 ml 0.05% Agarose pro 5000 Samen resuspendiert. Die Samen-Agarose-Lösung wird auf MSS Medium (1 x MS, 1% Saccharose, 0,8% Agarose, 50 µg/ml Kanamycin, pH 5,8) ausgebreitet (Platten mit 13,5 cm

Plasmid pDH51 (Pietrzak et al., *Nucl. Acids Res.* 14, 5857-5868) präpariert. B steht für ein *NotI/NotI*-Fragment der cDNA, flankiert von einer Polylinkerregion aus pT7T3 18U/*NotI* mit *KpnI* und *XbaI*-Schnittstellen mit der kodierenden Region des Nukleobasentransporters von *Arabidopsis thaliana* in Sinnorientierung zum Fragment A. Der in Fragment B eingezeichnete Pfeil gibt die Leserichtung der cDNA an. C steht für ein Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., 1984 *EMBO J.* 3, 835-846), Nukleotide 11749 bis 11939, welches als *PvuII/HindIII*-Fragment aus dem Plasmid pAGV40 (Herrera-Estrella et al., 1983, *Nature* 303, 209-213) isoliert und nach Addition eines *SphI*-Linkers an die *PvuII*-Schnittstelle zwischen die *SphI*- und die *HindIII*-Schnittstelle des Polylinkers von pBIN19 kloniert wurde.

Figur 6b zeigt eine schematische Darstellung des Plasmids p35S- $\alpha$ -PUP1, ein Derivat des Plasmids pBIN19 (Bevan, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12, 8711-8721). A und C stehen jeweils für den CaMV35S-Promotor und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Plasmids pTiACH5 (siehe Figur 6a). B steht für ein *SspI/HpaI*-Fragment der cDNA mit der kodierenden Region des Nukleobasentransporters von *Arabidopsis thaliana* in Antisinnorientierung zum Fragment A. Der in Fragment B eingezeichnete Pfeil gibt die Leserichtung der cDNA an.

## AUSFÜHRUNGSBEISPIEL

### 1. Allgemeine Methoden

- a) Klonierungsverfahren: Zur Klonierung in *E. coli* wurde der Vektor pT7T3 18U (Pharmacia) und zur Transformation von Hefen der Vektor pFL61 (Minet & Lacroute, 1990, *Curr. Genet.* 18, 287-291) eingesetzt. Zur Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR, ein Derivat von pBIN19 (Bevan, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12, 8711-8721), kloniert.
- b) Bakterien- und Hefestämme: Für die pT7T3 18U- und pFL61-Vektoren sowie für die pBinAR-Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Als Ausgangsstamm für die Expression der cDNA-Bibliothek in Hefe wurde der Hefestamm MG887 (Dubois

M 20:03:00

Leu Val Leu Glu Ile Gln Met Val Met Cys Leu Ala Ala Thr Phe Phe  
210 215 220

Cys Val Ile Gly Met Phe Ile Val Gly Asp Phe Lys Val Ile Ala Arg  
225 230 235 240

Glu Ala Arg Glu Phe Lys Ile Gly Gly Ser Val Phe Tyr Tyr Ala Leu  
245 250 255

Ile Val Ile Thr Gly Ile Ile Trp Gln Gly Phe Phe Leu Gly Ala Ile  
260 265 270

Gly Ile Val Phe Cys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Leu Ile Ser  
275 280 285

Val Leu Leu Pro Val Thr Glu Val Phe Ala Val Val Cys Phe Arg Glu  
290 295 300

Lys Phe Gln Ala Glu Lys Gly Val Ser Leu Leu Leu Ser Leu Trp Gly  
305 310 315 320

Phe Val Ser Tyr Phe Tyr Gly Glu Phe Lys Ser Gly Lys Lys Val Val  
325 330 335

Asp Lys Pro Gln Pro Pro Glu Thr Glu Leu Pro Ile Leu Pro Val Ser  
340 345 350

Asp Tyr Val Ala  
355

N 20.03.00

<400> 8

Met Lys Asn Gly Leu Ile Ile Ile Asn Cys Ile Ile Leu Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Thr Cys Gly Gly Pro Leu Leu Thr Arg Leu Tyr Phe Thr Asn Gly Gly  
20 25 30

Lys Arg Ile Trp Phe Met Ser Phe Leu Ser Thr Ala Gly Phe Pro Ile  
35 40 45

Ile Leu Ile Pro Leu Leu Val Ser Phe Leu Ser Arg Arg Arg Gly Asn  
50 55 60

Arg Asn Pro Asn Asn Ala Glu Asn Lys Arg Lys Thr Lys Leu Phe Leu  
65 70 75 80

Met Glu Thr Pro Leu Phe Ile Ala Ser Ile Val Ile Gly Leu Leu Thr  
85 90 95

Gly Leu Asp Asn Tyr Leu Tyr Ser Tyr Gly Leu Ala Tyr Leu Pro Val  
100 105 110

Ser Thr Ser Ser Leu Ile Ile Gly Thr Gln Leu Ala Phe Asn Ala Leu  
115 120 125

Phe Ala Phe Leu Leu Val Lys Gln Lys Phe Thr Pro Phe Ser Ile Asn  
130 135 140

Ala Val Val Leu Leu Thr Val Gly Ile Gly Ile Leu Ala Leu His Ser  
145 150 155 160

Asp Gly Asp Lys Pro Ala Lys Glu Ser Lys Lys Glu Tyr Val Val Gly  
165 170 175

Phe Leu Met Thr Val Val Ala Ala Leu Leu Tyr Ala Phe Ile Leu Pro  
180 185 190

Leu Val Glu Leu Thr Tyr Lys Lys Ala Arg Gln Glu Ile Thr Phe Pro  
195 200 205

4 5 20.03.00

acaaaagtta caaaaggaga gtatgtcaaa ggtttcatat gcaccgttgc tgcgtctgct 540  
ggttatggtc tagtcttata cctacaacag ctagcctttc taaaagtcct aaagaagcaa 600  
aatttctcag aagttatgga tatgataatc tacgtgagtc tagtggccag ttgtgttagc 660  
gtgggtggggc tttttgctag cagtgtgtgg aaaactttga gcagtgaaat ggataactac 720  
aaacatggga aggtatccta cattatgaac ctagtgtgga cagctgttac ctggcaggta 780  
ttctccatcg gtggcacagg actgatcttc gagctctcct ctctattctc aaatgcaata 840  
agcgttttgg gactcccagc ggttcctatc ttggctgtaa tcattttcca tgacaaaatg 900  
aatgggttaa aggtgatttc tatgatccta gctatttggg gtttcacttc ctatgtctac 960  
caacaatatc ttgatgacaa aaacttgaag aaaaatcatg aaatcacac aacagaatcc 1020  
cctgaccac cagaagcaga agagtcaact tggcaatcaa aataagctga tattttgaaa 1080  
g 1081

<210> 7

<211> 1071

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

gagggggatt ccacatctac tatgaagggg gatcaagaag tacaagtcac tggccaatca 60  
gttgctacaa ttctgggcag actatactat gaaaatggag gaaacagcaa atggctagca 120  
acggtagttc agctttagag ctttcctatt ctacttccat atcatctctt gtcagtcaaa 180  
acacatacaa caactcagag agatggcaaa ttaacctcac ttaggaacgc tgcattagtt 240  
tacatagtgc ttggacttct tgtaggagca gcttgctacc tatattccat tggactgctt 300  
tacctacctg tttctaccct ttccctgac tgtgcatcac agttagcctt caccgctttc 360  
ttctcttatt tactcaactc acaaaaactt actcctatca ttttgaattc tcttttcctc 420  
ctcactatat ctccaccct ccttgcattt aataacgagg aatcagattc caaaaaagtt 480  
acaaaaggag agtatgtcaa aggtttcgta tgcaccgttg gtgcatctgc tgggtttggg 540  
ctactcttat ccctacaaca gctagccttt cgtaaagttt taaagaagca aactttctca 600  
gaagttataa atatgataat ctacatgagt ctagtggcca gttgtgttag cgtggtgggg 660  
ctttttgcta gtagcgagtg gaaaactttg agcagtgaaa tggaaaacta caaacttggg 720  
aaggtatcct atgtcatgaa cctagtgtgg acagctgtta cctggcaggt attctccatc 780  
ggttgcacag gactgatctt cgagctttcc tccctattct caaatgcaat aagcgctttg 840  
ggactccccg tggttcctat cctggctgtc atcattttcc atgacaaaat gaacggctta 900  
aaggtgattt ctatgattct agctatttgg gggttcgtat cctatgtcta ccaacaatat 960  
cttgatgaaa caaacttgaa gaaaagtaat gaaataccaa caacagaatc ccctgaccga 1020  
ccagaagcag aaggggtcaag tgagcaatca aaataagctg ttacttcaaa g 1071

<210> 8

<211> 356

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

4  
M 20.03.00

<210> 5

<211> 1194

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

tcattgagata taataaacat gagtgttaat ttttcagggtg accagaactt agaagcaaac 60  
cttatagatc atgagggtggt aactgaatca tcatcatcag ctgtgcctca aaccgagaac 120  
tataaaagggt ggcttcgtgt ctccatatac gtaatctttg tcctcttttg ccagccacta 180  
gctacaattc tgggtagatt gtactatgaa aatggaggaa atagcacata tgtggtaaca 240  
cttcttcaac tcattggctt ccctgtactg gttctgttcc gcttcttttc tcgaatcagg 300  
caacccaaat caacagatac aaatttcagt cagtcccctt ccttcaccac ccttgcctcg 360  
gtttacttgt gcactggact gctagtgtcc gcttatgctt atttgtctgc agtaggggtg 420  
ctctacttac cagtctctac tttctccctc atcttggcct cacagttggc cttcactgcc 480  
tttttctcat atttccttaa ctgcgaaaag ttcactcctt tgatagtcag ttctttgctt 540  
ctcctcactg tatcctctgc tcttctgtg gtcaacactg attcagaaaa ctcaactaat 600  
gtatctagag tacagtatgt gatcgggttc atatgtacca tcggtgcttc cgctgggatt 660  
ggactgttac tatctctgat acaaatgctc ttcaggaaaag ttttcacgaa gcatacatcc 720  
tcagcagtca cggacttggc catttaccag tctctagttg cgagttgtgt agttctcata 780  
ggactttttg caagtggaga gtgggaaact ttgccaaagt agatgagaaa ctacaaactc 840  
gggaaagtgt catatgtttt gacttttagcc tcggcagcta tttcctggca agtctacact 900  
cttgggtcttg tgggattgat cttcgagtca tcctctgtgt tctccaattc cataacagct 960  
gtgggattgc ctatagttcc agttgcggca gtgatagttt tccatgatag aatggacgca 1020  
tcaaaaatct tctccattat tttagctatc tgcggtcttc tttcattcgt ctatcagcac 1080  
tacctcgacg aaaagaagtt gaatactagc cacacaagtg ctgtaggaga tcttcatcta 1140  
cctgttgagg aaggtcacac aaacatacaa agtgtgtgat caaagcatat ttcc 1194

<210> 6

<211> 1081

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

caaatccaac agttcaagat gaaagaaatt cagtcagtag cagccaagca gaagtatctc 60  
actctaacac atacaaacgg tggctcagga gtatactatg acaacggagg aaacagtaaa 120  
tggctagcaa cggtagttca acttggttggc tttcctgtgc tacttccata ttatatcttg 180  
tcatttaaaa cacatgcaac aactgataga gatggaaaaa gaacctcacc taggaaccgt 240  
gtattggttt acgtagtgtc tggacttctt gtaggagcag attgctatct gtactccatt 300  
ggacttcttt acttaccctg ttctacctat tccctgatct gtgcatctca gttagccttc 360  
aatgctttct tctcttattt tcttaactca caaaaactta cccctatcat tttaaattct 420  
cttttctctc taactatatc ttccacccta cttgcattca ataatgagga gacagactcc 480



N 20.03.00

<210> 2

<211> 1049

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

aagatgaaga tgaagacagt tcttgtaatc ataaactgta tattcttggc cattggaaac 60  
tgtggaggcc ctctaatagat gcgctctctac ttccaaaatg gtggcgaaag gatctggttt 120  
ccaagcttcc ttcaaaccgt tggttgtcca ctcatcttct tccctcttct cttatctttc 180  
ctccgcgctc gtcgttgcc tgaagaacaa gaaacgactc catttttcct catgaaacct 240  
cctctcttta tcgccgtat cgttggttgg ttgctcgtgg gatttgacaa ttacctctac 300  
tcttacgggt tagcttatat ccctgtttct actgcgtctt tgatcatctc cgcgcaatta 360  
ggcttcactg ctctctttgc attttttatg gtgaagcaaa agttcacacc tttcactata 420  
aacgctatcg ttttgctcac tgggtggtgcc gtagtccttg cccttaactc tgatagtgaac 480  
aagcttgcaa acgagacaca caaggaatat gttggtgggt tcatcatgac tcttgggtgca 540  
gctcttctct atgggtttat attgccactt gtcgagcttt cttacaagaa atctggtcag 600  
cgaatcacgt atacgctcgc gctcgagttc cagatggtct tatgctttgc tgccacttgt 660  
gtctgcctcg tggggatgct agccgctggc gatttcaagg tgatagcagg agaagcaaga 720  
gattttaagc ttggagagtc tttgtactat gtggtgattg tggtcacggc cataatctgg 780  
caagcatttt ttgtgggagc tattgggttg atcttctgtg catcgtctct ggtctctgga 840  
attatggtca gtgctctgct tccggtgacg gtgatcttgg ccgtcatttg cttccaggag 900  
aagtttcagg cggggaaagg tgtcgctttg gctctctccc tctggggatc agtctcttat 960  
ttctatggac aggttaaata cgaggagaag actaaggctc aggatacaca actgtctcag 1020  
cttccagtta ctgattatgt agcttaaaa 1049

<210> 3

<211> 1145

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 3

ctgtttcatg tgttgatggg agaacctgaa gggaaatctt caacagaaga gagaagtcac 60  
aagtactctt ggagggttaag agtgtctctc tatgtcactc tcctcttagc tggagagaca 120  
atagccactc tcttaggtag actttactac gaaaaaggcg gtaaaagcac atggctcgaa 180  
accttggttc agcttgtagg gtttctctta acccttcctt gctattatta cttaaagcct 240  
gagccgtcca agactaaaac cattaccaa aaaactactt cttccttctt gacactatct 300  
ttagtgtata ttggacttgg cttgcttgtt gctggacatt gtattttgta ctcatctggg 360  
ctactttacc ttctgtctc aactttctct ttgatctctg cgtcgcaatt ggcttttaac 420  
gccgtcttct cttacttcct aaactcaca aaaatcacac catttatact caattcactt 480  
gttctcttaa ccatactctc tacacttctt gttatccaac atgaaccaga atctccctct 540  
tctacttcaa agtccgcagc caagtccaag tatgtgattg gatacatctg cgcggtcggg 600



N 20.03.00

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Frommer, Prof. Dr. Wolf G.

<120> Pflanzlicher Nukleobasentransporter

<130> P29916

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1225

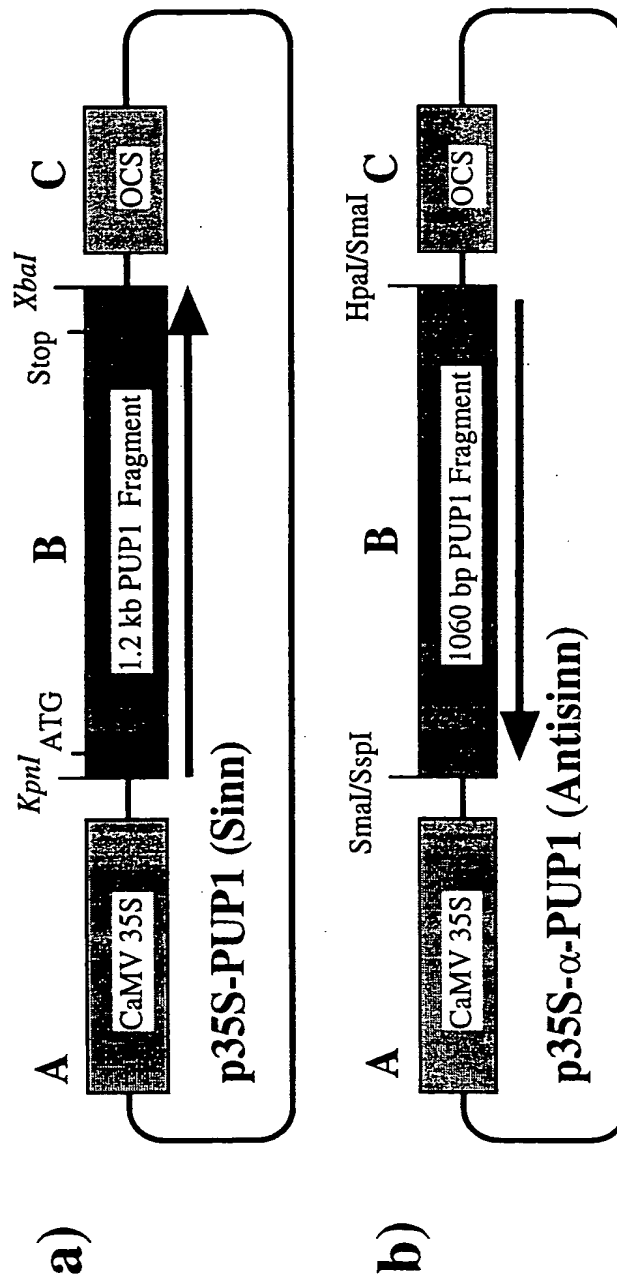
<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

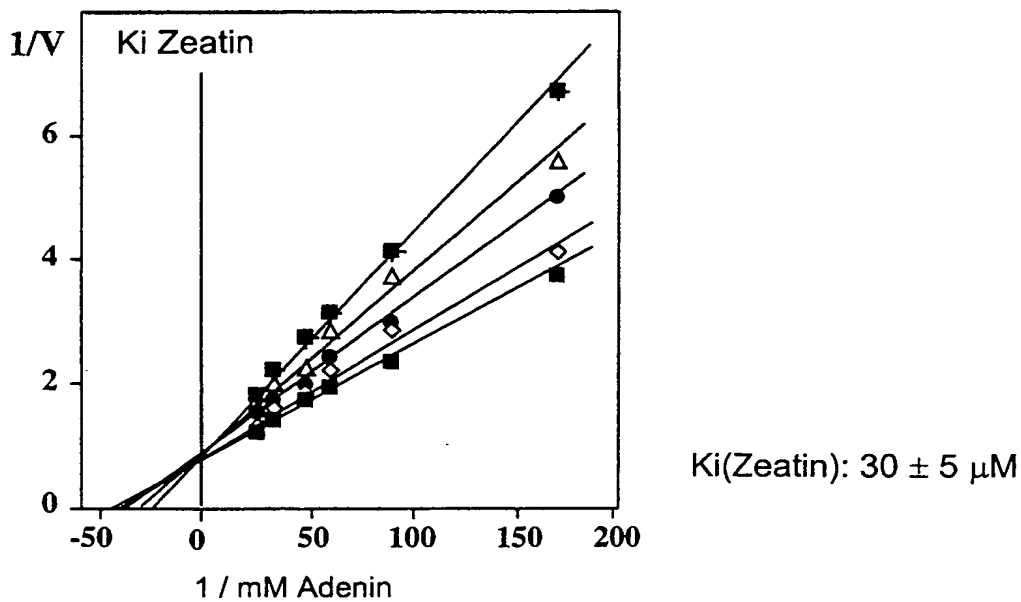
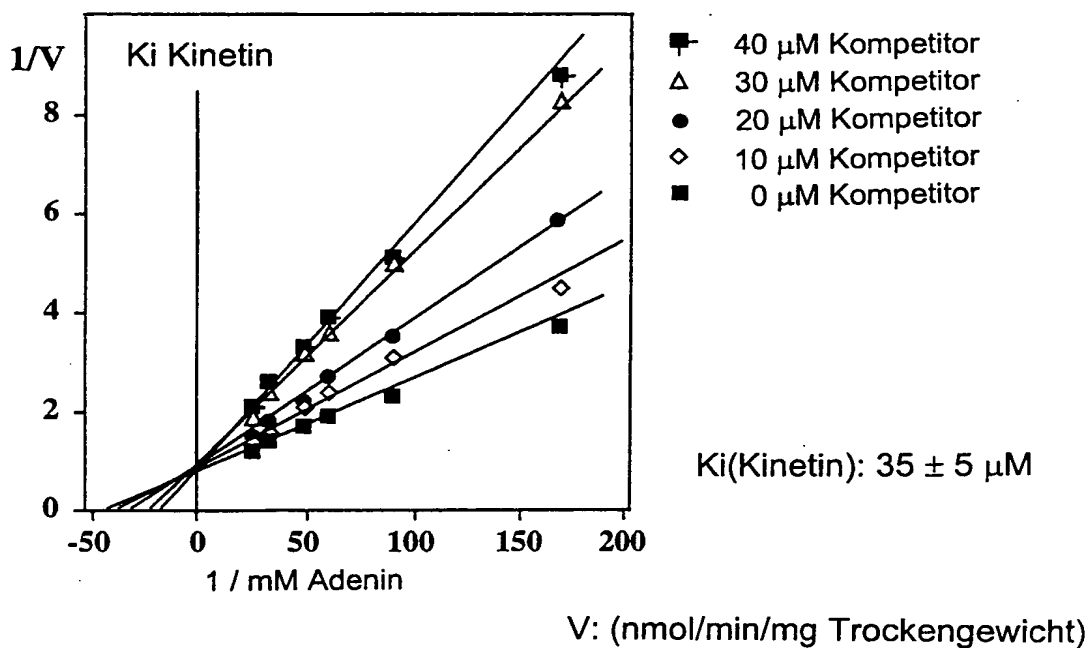
<400> 1

```
aaaacagcaa gcagcaagaa gaagatgaag aatggtttga taatcataaa ctgtattatc 60
ctcactatag gaacatgtgg aggtcctttg ttaactcgtc tctacttcac caatggcgga 120
aaacgaatct ggttcatgag cttcctatca accgctgggt ttccaatcat cctcatccct 180
ctcttgggtct ccttcctcag ccgtcgccgc ggcaaccgca accctaaca cgcggaaaaaac 240
aagcggaaaaa caaagctctt cctcatggaa actcctctgt ttatcgccct cattgtcata 300
gggttgctca caggacttga caactactta tattcttacg gattagcata tctgccagtt 360
tcaacttcat cgctcataat cggaactcaa ctagctttca acgctctctt cgctttcttg 420
ttagtcaagc aaaaagttcac tccgttctcc ataaacgccg tcgttttggt gacggttggt 480
atcgggatcc ttgcgttaca cagtgatgga gacaaaccgg ctaaggagag caagaaagag 540
tatgtgggtg gggtcttgat gactgtggtt gcagctcttc tctatgcttt tatattaccg 600
ctcgttgagc taacttaca gaaagctcgt caagaaatca ctttccact tgtgcttgag 660
attcagatgg tcatgtgcct tgctgctact tttttctgtg tcattggcat gttcatcggt 720
ggagatttta aggtgatagc aagagaagca agagagttca agattggagg atcagtgttt 780
tactatgcat tgatagtgat cacaggaata atatggcaag gtttcttctt aggagccata 840
gggattgtgt tttgtgcatc atcactagct tctgggtgtc tgataagtgt tctgcttccg 900
gtgactgaag ttttcgccgt cgtttgtttc cgggagaagt ttcaggcaga gaaaggtgtc 960
tctctacttc tttctctttg gggatttgct tcttacttct acggcgagtt taaatccggc 1020
aagaaaagttg ttgataaacc tcaaccgccg gagacagaac tgcctattct tccagttagt 1080
gattatgttg cttaatttct ataactctat acgattataa cagagcatta ctgttatgtt 1140
ttgttcctaa atattatgtg tgattgtgtg tttttgttat tgttcttgtg tataagtatg 1200
aataaaaattt gaaagatatt gagct 1225
```

Figur 6



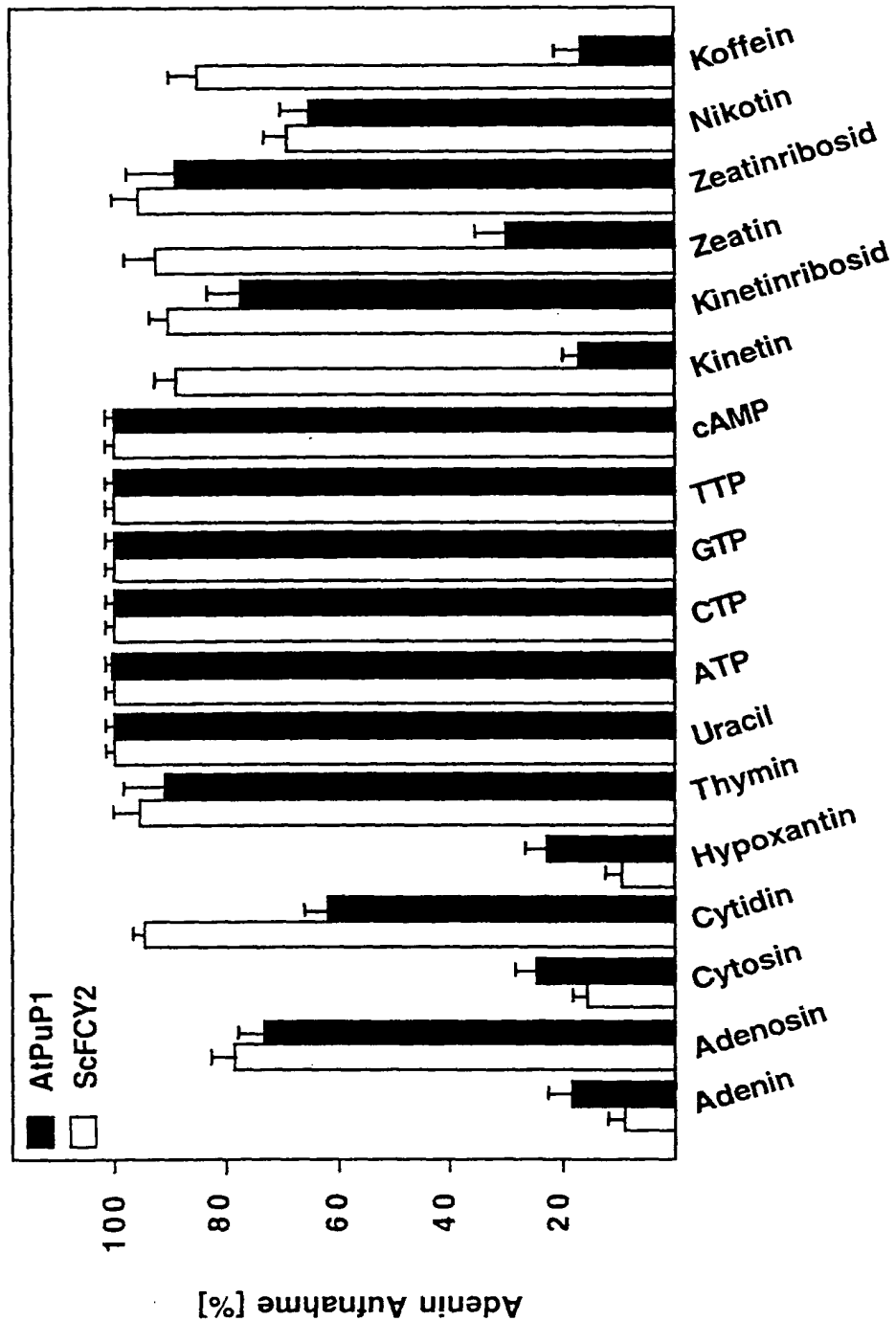
Figur 5



M 20.03.00

3/5

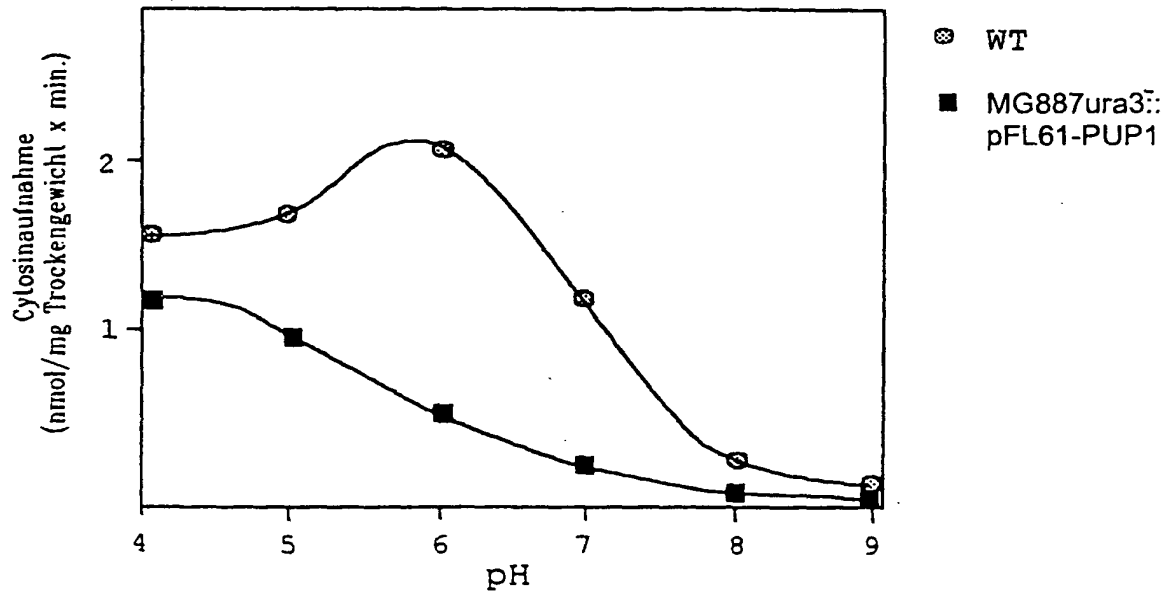
Figur 4



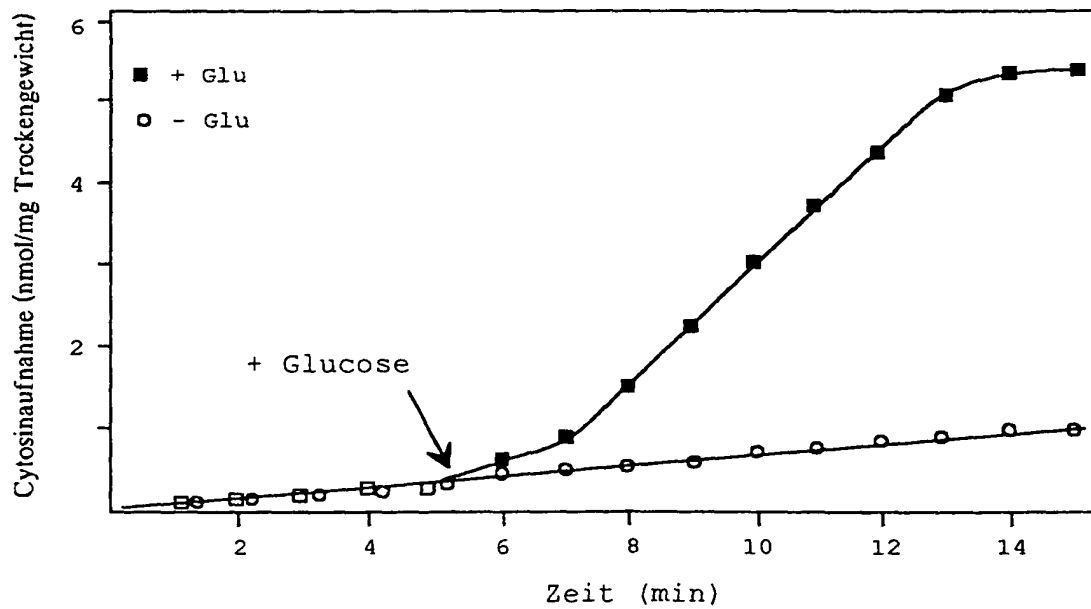
M 20:03:00

2/5

Figur 2



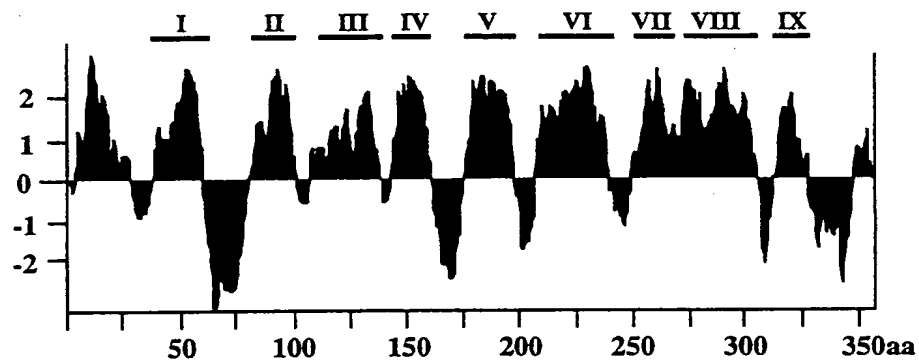
Figur 3



P1 20.03.00

1/5

Figur 1



M 20:03:00

31

### Zusammenfassung

#### **Pflanzlicher Nukleobasentransporter**

Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure, die für einen pflanzlichen Nukleobasentransporter kodiert, und verschiedene Verwendungen dieser Nukleinsäure. Ferner betrifft die Erfindung ein Fragment der Nukleinsäure, ein Konstrukt, das die Nukleinsäure und/oder ein Fragment davon enthält, und eine Wirtszelle mit der Nukleinsäure, dem Fragment und/oder dem Konstrukt. Von der vorliegenden Erfindung umfaßt werden ferner ein Verfahren zum Herstellen einer transgenen Pflanze unter Verwendung der vorgenannten Nukleinsäure sowie ein Verfahren zum Beeinflussen der Nukleobasentransporteigenschaften einer Pflanze, eines Pflanzenteils, einer Pflanzenzelle und/oder von Samen.

11 20.03.00

30

18. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 zur Isolierung homologer Sequenzen aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Tieren und/oder Menschen.

19. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 zur Expression eines Nukleobasentransporters in pro- und/oder eukaryontischen Zellen.

20. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 unter der Kontrolle eines regulatorischen Elements in Antisinnorientierung zur Hemmung der Expression eines endogenen Nukleobasentransporters in pro- und/oder eukaryontischen Zellen.

21. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 zur Herstellung transgener Nutzpflanzen.



12. Transgene Pflanze, Pflanzenteil, Wirtszelle und/oder Samen nach einem der Ansprüche 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Nukleinsäure bzw. das Fragment bzw. das Konstrukt an einer Stelle in das Genoms integriert ist, die nicht seiner natürlichen Position entspricht.

13. Protein erhältlich durch Expression einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 in einer Wirtszelle.

14. Antikörper, der mit einem Protein nach Anspruch 13 reagiert.

15. Verfahren zum Herstellen einer transgenen Pflanze, das die folgenden Schritte umfaßt:

- Einbringen einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 und/oder eines Fragments dieser Nukleinsäuren in eine Pflanzenzelle; und
- Regenerieren einer Pflanze aus der transformierten Pflanzenzelle.

16. Verfahren zum Beeinflussen der Nukleobasentransportereigenschaften einer Pflanze, eines Pflanzenteils, einer Pflanzenzelle und/oder von Samen, das den Schritt umfaßt:

- Einbringen einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 und/oder eines Fragments dieser Nukleinsäuren in eine Pflanzenzelle und/oder eine Pflanze.

17. Verwendung einer Pflanzenzelle nach Anspruch 10 zur Regeneration und Herstellung ganzer Pflanzen.

4. Fragment einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß es in Antisinnorientierung zu einem Promoter die Expression eines Nukleobasentransporters in einer Wirtszelle hemmen kann.
5. Fragment nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß es mindestens 10 Nukleotide, vorzugsweise mindestens 50 Nukleotide, besonders bevorzugt mindestens 200 Nukleotide umfaßt.
6. Konstrukt enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder ein Fragment nach einem der Ansprüche 4 oder 5 unter der Kontrolle von die Expression regulierenden Elementen.
7. Konstrukt nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich die Nukleinsäure bzw. das Fragment in Antisinnorientierung zu dem regulatorischen Element befindet.
8. Konstrukt nach einem der Ansprüche 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß es in einem Plasmid vorliegt.
9. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder eine Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 und/oder ein Fragment der vorgenannten Nukleinsäuren und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 6 bis 8.
10. Wirtszelle nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus Bakterien, Hefezellen, Säugerzellen und Pflanzenzellen ausgewählt wird.
11. Transgene Pflanze sowie Pflanzenteile und/oder Samen der Pflanze enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder eine Nukleinsäure mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5 und/oder ein Fragment der vorgenannten Nukleinsäuren und/oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 6 bis 8.

### Patentansprüche

1. Nukleinsäure, die für einen pflanzlichen Nukleobasentransporter kodiert, ausgewählt aus:

- a) Nukleinsäure, die erhältlich ist durch Komplementierung Nukleobasentransporter-defizienter Wirtszellen mit einer pflanzlichen Genbank und Selektion auf Nukleobasentransporter-positive Wirtszellen;
- b) Nukleinsäure mit einer Sequenz, die für ein Protein mit einer Sequenz nach der SEQ ID NO 8 kodiert;
- c) Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure nach b) hybridisiert;
- d) Nukleinsäure, die unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes mit einer Nukleinsäure nach b) oder mit der zu b) komplementären Sequenz hybridisieren würde;
- e) durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltene Derivate einer Nukleinsäure nach a) bis d);
- f) Komplementäre Nukleinsäure zu einer Nukleinsäure nach einer der Gruppen a) bis e);

ausgenommen sind Nukleinsäuren mit einer Sequenz nach einer der SEQ ID NO 3 bis 5.

2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die kodierende Sequenz einer der Sequenzen nach den SEQ ID NO 1, 2, 6 oder 7 umfaßt oder ein von diesen durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen abgeleitetes Derivat.

3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine DNA ist.

11 20.03.00

26

Hierzu war ein *PvuII*/*HindIII*-Fragment (nt 11749-11939) aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al., 1983, *Nature* 303, 209-2139) an der *PvuII*-Schnittstelle mit einem *SphI*-Linker versehen worden. Das Polyadenylierungssignal trägt in der Plasmidkarte die Bezeichnung "C".

Nach Transformation von Agrobakterien mit den Plasmiden p35S-PUP1 und p35S- $\alpha$ -PUP1 wurden diese zur Vakuuminfektion von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt.

Zehn unabhängig erhaltene Transformanten für beide Konstrukte, in denen die Präsenz des intakten, nicht rearrangierten chimären Gens mit Hilfe von "Southern blot"- Analysen nachgewiesen worden war, wurden bezüglich der Veränderungen im Nukleobasen-transport untersucht.

transportergens zur Veränderung des Transports von Nukleobasen und ihren Derivaten wird hier am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Die Anwendung ist aber nicht auf diese Spezies beschränkt.

- a) Überexpression: Das 1.2kb *NotI*-Fragment aus dem Plasmid pFL61-PUP1, das als Insertion die cDNA für einen Nukleobasentransporter von *Arabidopsis thaliana* enthält, wurde in den mit *NotI* geschnittenen Vektor pT7T3 18U/*NotI* kloniert. Der Vektor pT7T3 18U/*NotI* wurde erzeugt, indem in die *SmaI*-Schnittstelle von pT7T3 18U (Pharmacia) ein *NotI*-Linker eingefügt wurde. Die Orientierung des Fragments wurde durch eine Restriktionsspaltung überprüft. Der Vektor enthält eine *KpnI*- und eine *XbaI*-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsstelle, so daß die AtPUP1-cDNA aus diesem Vektor als *KpnI*-*XbaI*-Fragment isoliert werden konnte. Dieses 1.2kb *KpnI*-*XbaI*-Fragment wurde in den *KpnI*-*XbaI* geschnittenen Vektor pBinAR, ein Derivat von pBIN19 (Bevan, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12, 8711-8720), kloniert. Das resultierende Plasmid wurde p35S-PUP1 genannt.
- b) Antisinn-Repression: Aus dem Plasmid pFL61-PUP1 wurde ein 1,1 kb großes *HpaI*-*SspI*-PUP1-Fragment isoliert und in Antisinn-Orientierung in die *SmaI*-Schnittstelle von pBinAR kloniert. Die Orientierung des Fragments wurde durch eine Restriktionsspaltung überprüft (Daten nicht gezeigt). Das resultierende Plasmid wurde p35-a-PUP1 genannt.

Die PUP1-cDNA Fragmente tragen in den Figuren 6a und 6b die Bezeichnung "B". Je nachdem, ob B in Sinnorientierung zum CaMV-35S-Promotor von pBinAR eingeführt wurde oder nicht, trägt das entstandene Plasmid die Bezeichnung p35S-PUP1 bzw. p35S- $\alpha$ -PUP1. Zwischen dessen *EcoRI*- und *KpnI*-Schnittstellen wurde ein Fragment aus dem Genom des Blumenkohlmosaik-Virus, das den 35S-Promotor (nt 6909-7437) trägt, eingefügt. Das Promotorfragment wurde als *EcoRI*/*KpnI*-Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al., *Nucl. Acids Res.* 14, 5857-5868) präpariert. In der Plasmidkarte trägt das Promotorfragment die Bezeichnung "A". Zwischen der *SphI*- und der *HindIII*-Schnittstelle von pBinAR ist außerdem das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., *EMBO J.* 3, 835-846) eingefügt.

Figur 2 zeigt, daß die durch den PUP1 Nukleobasentransporter vermittelte Cytosinaufnahme in den Hefestamm MG877ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 von dem pH-Wert abhängig ist. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Adeninaufnahme erzielt (Daten nicht gezeigt). Wie in Fig. 3 gezeigt, ist die durch den PUP1-Nukleobasentransporter vermittelte Cytosinaufnahme in dem Hefestamm MG877ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 glucoseabhängig. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Adeninaufnahme erzielt (Daten nicht gezeigt). Die Aktivitätszunahme bei Glukosezugabe kann als Hinweis auf eine Energieabhängigkeit gewertet werden. Dieses so wie die beobachtete Aktivitätszunahme bei abnehmendem pH-Wert deutet auf einen sekundäraktiven, protonengekoppelten Aufnahmemechanismus hin.

Zur Untersuchung der Substratspezifität des in Hefe exprimierten PUP1-Nukleobasentransporters im Vergleich zu dem Hefe-eigenen FCY2-Transporter wurden Kompetitionsexperimente mit nicht-radioaktiven Substraten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in Fig. 4 gezeigt. Die Aufnahme von radioaktiv markiertem Adenin wurde gemessen und als 100% gesetzt (entspricht 1,7 bzw. 0,9 nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> Trockengewicht). Die Messungen wurden bei einer Substratkonzentration von 25 µM durchgeführt. Die Kompetitoren wurden in 10fachem molarem Überschuß eingesetzt.

Zur Analyse der kompetitiven Inhibition des durch den PUP1-Nukleobasentransporters vermittelten Adenintransports durch die Cytokinine Kinetin und Zeatin wurden Aufnahmeversuche mit verschiedenen Konzentrationen von radioaktiv markiertem Adenin sowie unterschiedlichen Kompetitor-Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Figur 5 in Form einer Lineweaver/Burk-Auftragung dargestellt. Aus dieser Lineweaver/ Burk-Auftragung wurde jeweils die Inhibitor-Konstante K<sub>i</sub> ermittelt (35 µM für Kinetin und 30 µM für Zeatin). Die kompetitive Hemmung zeigt, daß die Cytokinine ebenfalls Substrate für den Transport über den PUP1-Nukleobasentransporter darstellen.

##### 5. Transformation von Pflanzen mit Konstruktionen zur Überexpression bzw. Antisinn-Repression eines Nukleobasentransportergens

Das Einbringen einer für einen pflanzlichen Nukleobasentransporter kodierenden Nukleinsäure und die Überexpression bzw. die Antisinn-Repression eines Nukleobasen-

PUP1 angegeben. Zur Berechnung der intrazellulären Konzentration wurde das Zellvolumen auf das vierfache des Trockengewichts geschätzt (Ninnemann et al, 1994, *EMBO J.* 15, 3464-3471). Die Aufnahme erfolgt entgegen einem Konzentrationsgradienten.

Tabelle 1

	<i>Anfangskonz. Medium</i>	<i>Endkonz. Medium</i>	<i>Endkonz. Zellen</i>	<i>Anreicherungs- faktor</i>
Adenin	200 $\mu$ M	155 $\mu$ M	2350 $\mu$ M	15
Cytosin	200 $\mu$ M	145 $\mu$ M	2660 $\mu$ M	18

Der Einfluß von verschiedenen Inhibitoren auf die durch den PUP1-Nukleobasentransporter vermittelte Adenin- bzw. Cytosinaufnahme in dem Hefestamm MG887ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 wird in Tabelle 2 gezeigt. Die Inhibitoren wurden fünf Minuten vor Anfang der Messungen zu den Zellen hinzugegeben. Die Protonophoren Carbonyl-Cyanid-m-Chlorphenylhydratzon (CCCP) und 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) und der H<sup>+</sup>/ATPase-Inhibitor Diethylstilbestrol blockieren die Aufnahme. Dies kann als klarer Hinweis auf einen sekundäraktiven, protonengekoppelten Aufnahmemechanismus gewertet werden.

Tabelle 2

<i>Inhibitor</i>	<i>relative Adeninaufnahme [%]</i>	<i>relative Cytosinaufnahme [%]</i>
ohne Inhibitor	100	100
100 $\mu$ M Diethylstilbestrol	4	8
100 $\mu$ M DCCD	47	55
100 $\mu$ M CCCP	13	20
100 $\mu$ M 2,4-DNP	54	58
10 $\mu$ g/ml Cycloheximid	95	97

## 4. Aufnahmestudien mit $^{14}\text{C}$ -markiertem Adenin an dem Hefe-Stamm MG887ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1

Für die Messung der Aufnahmeraten wurden die Hefe-Stämme MG887ura3<sup>-</sup>::pFL61, MG887ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 und deren Ausgangsstamm  $\Sigma 1278\text{b}$  (Dubois & Grenson, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 175, 67-76) in Vollmedium (YPD) ohne Uracil und mit 2% Glukose als Kohlenstoffquelle bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 28°C angezogen. Die Zellen wurden bei 3000 g geerntet, zweimal mit Wasser gewaschen und mit Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 4,5), 1% Glucose auf eine OD<sub>600</sub> von 12 eingestellt. Die Zellsuspension wurde in 100 µl Portionen bis zum Beginn des Aufnahmeexperiments auf Eis gelagert. Vor dem Start der Aufnahmemessungen wurden die Zellen für 2 min bei 30°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde dann gestartet, indem zu 100 µl Zellsuspension 100 µl der radioaktiv markierten Substratlösung gegeben wurde. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30°C inkubiert und nach 30, 60, 120, 180 Sekunden wurde jeweils 50 µl der Suspension entnommen und in 4 ml eiskaltes Wasser gegeben (bei Messungen über 180 Sekunden wurde dementsprechend mehr Zellsuspension und Substratlösung eingesetzt). Die Zellen wurden auf Glasfaserfilter gesaugt und mit 4 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Die Radioaktivität auf den Filtern wurde anschließend im Flüssigkeits-Szintillationszähler ermittelt.

Substratlösung: Bei der Substratlösung handelt es sich um einen 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 4,5 mit 1% Glukose und 9,25 Bq/µl des radioaktiv markierten Substrats (25-100 µM [ $^{14}\text{C}$ ]-Adenin oder [ $^{14}\text{C}$ ]-Cytosin). Darüber hinaus enthält die Substratlösung das nicht markierte Substrat, eventuelle Inhibitoren und Kompetitoren in 2facher Endkonzentration. Zur Bestimmung des pH Optimums wurde auch der pH-Wert des Natriumphosphatpuffers verändert. Bei der Messung des Einflusses von Glucose auf die Aufnahmeraten enthielt weder die Zellsuspension noch die Substratlösung Glukose. Glukose wurde erst nach dem Start der Aufnahmemessungen zum Meßansatz in einer Endkonzentration von 1% hinzugefügt.

In Tabelle 1 wird die durch den PUP1-Nukleobasentransporter vermittelte Aufnahme von radioaktiv markiertem Adenin und Cytosin durch den Hefestamm MG887ura3<sup>-</sup>::pFL61-



Vektors mit einer cDNA-Insertion wurden in den Hefestamm MG887ura3<sup>-</sup> nach der Methode von Dohmen et al. (1991, *Yeast* 7, 691-692) transformiert. Hefetransformanten, die auf Minimalmedium mit 1 mM Adenin als einziger Stickstoffquelle wachsen konnten, wurden vermehrt. Aus diesen Klonen wurde Plasmid-DNA nach Standardverfahren isoliert. Der Stamm MG887ura3<sup>-</sup> wurde erneut mit dem isolierten Plasmid transformiert. Auf diese Weise wurde ein Plasmid pFL61-PUP1 erhalten, das die *fcy2*-Mutation komplementieren kann. Dieses Plasmid hat eine Insertion mit einer Größe von 1,2 kb, die das PUP1- Nukleobasentransportergen enthält.

Der durch Transformation von MG887ura3<sup>-</sup> mit dem Plasmid pFL61-PUP1 erhaltene Hefestamm MG887ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 wird für Aufnahmestudien mit Adenin oder Nukleobasen verwendet. Durch gentechnische Veränderung der Kodierregion des Nukleobasentransportergens PUP1 nach Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können dessen Spezifität bzw. die Eigenschaften des Transportmechanismus verändert werden. Der Stamm MG887ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 eignet sich direkt für die Untersuchung von Inhibitoren oder Promotoren des Nukleobasentransports.

Das von dem Hefestamm M887ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 exprimierte PUP1-Protein wurde einer Hydrophobizitätsanalyse nach Kyte und Doolittle unterzogen. Wie aus Fig. 1 ersichtlich, weist das PUP1-Protein 9-12 stark hydrophobe Regionen (positive Werte auf der Y-Achse) auf, die lang genug sind, um jeweils einmal die Membran zu durchspannen. Die erste hydrophobe Region ist nicht bei allen PUP-Proteinen konserviert.

### 3. Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pFL61-PUP1

Aus dem Hefe-Stamms MG887ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1 wurde das Plasmid pFL61-PUP1 isoliert und mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide wurde die Insertion nach der Methode von Sanger et al. (1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467) sequenziert. Die kodierende Sequenz des PUP1-Gens wird in SEQ ID NO 1 und die davon abgeleitete Proteinsequenz in SEQ ID NO 8 wiedergegeben.

Durchmesser für 5000 Samen). Zur Reduzierung des Feuchtigkeitsverlustes werden die Platten mit Parafilm® verschlossen. Die Kanamycin-resistenten Pflanzen werden in Erde umgesetzt. Samen dieser Pflanzen werden geerntet und analysiert.

e) Nachweis der Nukleobasentransporter-Aktivität: Der Aktivitätsnachweis kann beispielsweise durch Aufnahmeexperimente mit radioaktiven Substraten (z.B. [<sup>14</sup>C]-Adenin) in die mit dem pflanzlichen Transportergen unter Kontrolle des Hefepromotors transformierten *fcy2*-Hefemutante (MG877ura3<sup>-</sup>::pFL61-PUP1), prinzipiell wie bei Ninnemann et al., 1994 (*EMBO J.* 15, 3464-3471) beschrieben, durchgeführt werden. Alternativ können andere Expressionssysteme, z.B. *Xenopus*-Oocyten (Boorer et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271, 2213-2220), unter Verwendung elektrophysiologischer Meßmethoden eingesetzt werden.

## 2. Klonierung des PUP1-Nukleobasentransportergens aus *Arabidopsis thaliana*

Die Klonierung des PUP1-Nukleobasentransporters erfolgt durch Komplementation des Hefe-Stamms MG887ura3<sup>-</sup> (*fcy2*) (diese Arbeit; Vorstufe MG887 Grenson 1969, *Eur. J. Biochem.* 11, 249-260) mit einer cDNA-Genbank aus *Arabidopsis thaliana* und Selektion der Nukleobasentransporter-positiven Zellen. Die *fcy2*-Hefemutante kann in Medien mit Adenin oder Cytosin als einziger Stickstoffquelle nicht wachsen (Grenson, 1969, *Eur. J. Biochem.* 11, 249-260; Polak & Grenson, 1973, *Eur. J. Biochem.* 32, 276-282). Zur Einführung eines Auxotrophiemarkers (ura3<sup>-</sup>) wurde die Nukleobasenaufnahmefehiziente Mutante MG887 (Dubois & Grenson, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 175, 67-76) mit einem Fragment des URA3-Gens transformiert, welches eine interne Deletion trägt. Durch Selektion auf der toxischen Vorstufe 5-Fluoroorotat konnte eine URA3-defiziente Mutante MG887ura3<sup>-</sup> isoliert werden.

Zur Komplementation der Nukleobasentransport-Mutation des Hefestamms MG887ura3<sup>-</sup> wird im Hefe-Expressionsvektor pFL61 (Minet & Lacroute, 1990, *Curr. Genet.* 18, 287-291) klonierte cDNA aus jungen Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* (Zwei-Blatt-Stadium) verwendet (Minet et al., 1992, *Plant J.* 2, 417-722). Etwa 1 µg des